·基础研究·

人骨形成蛋白2基因成骨诱导作用研究*

郭 勇[1] 张西正[1] 武继民[1] 李 娜[1] 赵红斌[1] 毛 艳[1]

摘要 **目的**:制备一种具有成骨活性的生物材料。**方法**:将人BMP2-pcDNA3.1质粒添加到壳聚糖-胶原海绵支架材料中,然后将大鼠成骨细胞和成纤维细胞分别接种在该复合材料中,体外培养细胞-支架材料复合物,另外将该材料植入BALBc小鼠皮下,以添加了pcDNA3.1质粒的壳聚糖-胶原海绵支架材料为对照。10天以后,取出细胞-支架材料复合物和皮下植入物,分别检测样品的碱性磷酸酶活性和钙含量。**结果**:与对照相比,体外培养细胞-支架材料复合物中的碱性磷酸酶活性和钙含量均显著提高;小鼠皮下植入物的碱性磷酸酶活性和钙含量也分别提高了61.5%和16.2%。**结论**:添加了人骨形成蛋白2基因的壳聚糖-胶原海绵支架材料具有成骨诱导活性,这种材料为骨组织工程中的成骨诱导可能提供一种新的方法。

关键词 骨形成蛋白2;成骨诱导;组织工程

中图分类号:R318,R496 **文献标识码**:A **文章编号**:1001-1242(2006)-07-0579-03

Osteoinduction of human bone morphogenetic protein 2 gene/GUO Yong,ZHANG Xizheng,WU Jimin,et al.// Chinese Journal of Rehabilitation Medicine,2006,21(7):579—581

Abstract **Objective**:To prepare a biomaterials which can stimulate osteogenesis. **Method**:The BMP2-pcDNA3.1 plasmid was appended to a kind of spongy scaffold made of chitosan and collagen. The osteoblasts and fibroblasts of Wistar rats were seeded in the spongy scaffold separately. Then the cells-scaffold composites was cultured in vitro. At the same time, the scaffold materials were implanted subcutaneously into BALBc mice. The spongy scaffold appended pcDNA3.1 plasmid was treated as control scaffold material. After10 days, the cells-scaffold composites and the subcutaneous implants were taken out. The alkaline phosphatase activity and Ca content in these samples were detected separately. **Result**:Compared with the control group, the alkaline phosphatase activity and Ca content of the cells-scaffold composites both increased remarkably. The alkaline phosphatase activity and Ca content of the subcutaneous implants were increased by 61.5% and 16.2% separately.**Conclusion**:After appended BMP2 gene, the spongy scaffold material made of chitosan and collagen can stimulate osteogenesis.The study may provide a new method for osteoinduction of bone tissue engineering.

Author's address Institute of Medical Equipment,Academy of Military Medical Science,Tianjin, 300161

Key words bone morphogenetic protein 2;osteoinduction;tissue engineering

骨形成蛋白(bone morphogenetic protein,BMP)是一种广泛分布于动物骨组织中的酸性蛋白质,能在非骨组织如肌肉中诱导新骨形成,是一种高效的骨诱导物质,在骨及牙齿的生长和损伤修复中发挥重要作用[1]。BMP属于转化生长因子(transforming growth factor,TGF-β)超家族中的一员,其中BMP2被认为是活性最强的唯一能单独诱导成骨的因子[2]。骨组织工程中必须保证种子细胞处于良好的成骨分化状态,这就需要好的成骨诱导因子,BMP2就是一种良好的成骨诱导蛋白,但天然的BMP2含量很少,提纯得到的杂质较多且成本高。BMP2在骨组织工程和骨修复上已得到广泛的应用,主要是将该蛋白与生物材料复合,制备出骨修复材料,另外还用它诱导成骨细胞的分化,得到骨组织工程的种子细胞[3-4]。近年来有研究者以BMP2基因转染骨髓间充质干细胞,在体外使该细胞定向分化为成骨细胞,从而为骨组织工程提供种子细胞[5],也有研究者通过BMP2基因重组腺病毒转染骨髓细胞,然后植入体内来诱导骨形成[6]。国内的研究者以人BMP2基因转染兔骨髓基质干细胞,种植去抗原牛松质骨支架体外构建组织工程骨[7],还有研究者用腺病毒介导的人重组骨形成蛋白2基因转染骨骼肌干细胞复合脱钙骨基质构建基因化组织工程骨,并通过自体移植的方法进行兔桡骨大范围缺损修复[8]。本实验利用本室构建的BMP2-pcDNA3.1真核表达载体质粒(通过基因克隆的方法,将包含信号肽的BMP2编码基因cDNA片段克隆在pcDNA3.1真核表达载体中而获得),并将该载体质粒添加到生物支架材料上,利用BMP2基因的作用使材料具有成骨诱导功能,为骨组织工程中的成骨诱导提供一种新的方法。

*基金项目:国家自然基金资助项目(10172093)

1 军事医学科学院卫生装备研究所,天津,300161

作者简介:郭勇,男,助理研究员,在读博士生

收稿日期:2005-11-15

1 材料与方法

1.1 材料

各种限制性内切酶 (北京鼎国生物公司)pcDNA3.1 载体 (购 Promega 公司),BMP2-pcDNA3.1 真核表达载体(本室构建),无内毒素质粒大提试剂盒(北京天为时代科技公司),Wistar 新生大鼠(军事医学科学院卫生学与环境医学研究所),BalBc 小鼠(中国医学科学院血液病研究所),壳聚糖-胶原海绵(本室自制), 碱性磷酸酶检测试剂盒和钙检测试剂盒(南京建成生物技术公司)。

1.2 质粒的提取

分别将 pcDNA3.1 和 BMP2-pcDNA3.1 转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞。将转化菌于含 100mg/L 氨苄青霉素的 LB 平板上 37℃孵育 16h,蓝白斑筛选阳性克隆,挑选多个白色单菌落扩大培养。采用碱裂解法提取质粒 DNA,经 EcoRI 和 NotI 双酶切,1%琼脂糖凝胶电泳,筛选阳性克隆。以阳性克隆 DNA 为模板进行 PCR 反应 (引物),PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳进一步验证克隆质粒中包含 BMP2 基因。将阳性菌落进行扩大培养, 用无内毒素质粒大提试剂盒提纯质粒,按照试剂盒说明书进行。

1.3 大鼠成骨细胞的培养

断颈处死出生 3 天的 Wistar 大鼠乳鼠,无菌条件下取出其颅盖骨, 剖离骨膜, 将骨块剪成 1mm×1mm 左右的碎片, 贴于 25ml 培养瓶壁上, 加入含 20%胎牛血清的 DMEM 培养液,3 天后细胞从骨片边缘爬出,8 天后细胞长至融合单层, 以 0.125%胰蛋白酶消化传代培养, 传代细胞经碱性磷酸酶(ALP)组织化学染色和矿化结节的染色,均为阳性,可知其为成骨细胞,将第 3 代成骨细胞用于实验。

1.4 成骨细胞-生物支架材料复合物的培养

大量提纯 BMP2-pcDNA3.1 质粒和 pcDNA3.1 质粒,然后分别将这两种质粒添加到壳聚糖-胶原海绵支架材料上。将 2×10^7/ml 浓度的成骨细胞分别接种到添加了 BMP2-pcDNA3.1 壳聚糖-胶原海绵支架材料和添加了 pcDNA3.1 的壳聚糖-胶原海绵支架材料上。将细胞-材料复合物置于 CO_2 含量为 5%体积分数, 温度为 37℃的 CO_2 培养箱中培养, 每 3 天换一次培养液。

1.5 成纤维细胞-生物支架材料复合物的培养

无菌条件下取新生 Wistar 大鼠背部皮肤,原代分离培养真皮成纤维细胞并传代培养。将 2×10^7/ml 浓度的成纤维细胞分别接种到添加了 BMP2-pcDNA3.1 壳聚糖-胶原海绵支架材料和添加了 pcDNA3.1 的壳聚糖-胶原海绵支架材料上。将细胞-材料复合物置于 CO_2 含量为 5%体积分数, 温度为 37℃的 CO_2 培养箱中培养,每 3 天换一次培养液。

1.6 细胞-生物支架材料复合物的生物化学检测

取出培养 10 天的成骨细胞-生物支架材料复合物和成纤维细胞-生物支架材料复合物, 以添加了 BMP2-pcDNA3.1 质粒的支架材料-细胞复合物为实验组,以添加了 pcDNA3.1 体质粒的支架材料-细胞复合物为对照组。用 D-Hanks 缓冲液洗复合物 3 次,称重后以玻璃匀浆器充分研磨这些复合物,分别用碱性磷酸酶检测试剂盒和钙检测试剂盒检测复合物中的碱性磷酸酶活性和钙含量, 按照试剂盒说明书进行, 以添加了 pcDNA3.1 质粒的支架材料为对照。

1.7 小鼠皮下植入物的生物化学检测

将添加了 BMP2-pcDNA3.1 质粒的支架材料植入 2 月龄 BalBc 小鼠皮下,10 天后取出皮下植入物,分别检测其碱性磷酸酶活性和钙含量,以添加了 pcDNA3.1 质粒的支架材料为对照。

1.8 统计学分析

采用 SPSS10.0 软件进行组间数据的 t 检验,所有检测到的数据均以平均值±标准差来表示。

2 结果

质粒的提取:质粒经 PCR 反应结果(图 1)和双酶切结果 (图 2) 证明为含有 BMP2 基因的重组质粒。细胞-生物支架材料复合物及小鼠皮下植入物生物化学检测见表 1。由表 1 可看出,与对照组相比,实验组成骨细胞-支架材料复合物中的碱性磷酸酶活性提高了 60%,钙含量增加了 1.40 倍。与对照组相比,实验组成纤维细胞-支架材料复合物中的碱性磷酸酶活性提高了 83%,钙含量增加了 54%。与对照组相比, 实验组皮下植入物的碱性磷酸酶活性提高了 61.5%,钙含量增加了 16.2%。

图 1 重组体 BMP2-pcDNA3.1 PCR
a:扩增产物
b:DNA markerDL2000

图 2 重组体 BMP2-pcDNA3.1 双酶切
a:双酶切产物
b:DNA marker DL15000
c:DNA marker DL2000

表 1 成骨细胞、成纤维细胞–生物支架材料复合物及小鼠皮下植入物的碱性磷酸酶活性和钙含量

组 别	鼠数	碱性磷酸酶(U/g)	钙含量(mg/g)
成骨细胞–生物支架材料复合物			
实验组	6	0.0718±0.005	0.166±0.087
对照组	6	0.0450±0.007①	0.069±0.063
成纤维细胞–生物支架材料复合物			
实验组	6	0.0568±0.008	0.094±0.12
对照组	6	0.0310±0.005①	0.061±0.07
小鼠皮下植入物			
实验组	6	0.0827±0.009	0.314±0.12
对照组	6	0.0525±0.013①	0.267±0.07①

两组相比①$P<0.01$

3 讨论

BMP 是一种高度保守的蛋白，例如鼠和人 BMP2 基因序列虽然有不同的地方，但其成熟肽的蛋白序列是相同的 [9]，所以具有跨种诱导成骨的能力而无免疫反应，因而从不同种属动物骨基质中分离出的 BMP 已用于临床研究。但从动物骨基质中纯化 BMP，因其含量少而难以广泛应用于临床研究。随着基因工程技术的发展,多种动物 BMP 基因被克隆和测序，现已发现 BMP 有近 20 个亚型。其中 BMP2 具有较强的单独成骨能力[2],可以利用基因工程技术对其基因进行克隆和表达，最终制备出可满足临床研究和应用的 BMP2，国内外许多实验室已制备了不少 BMP2 基因的真核和原核表达载体,其中原核表达的 BMP2 已在动物实验中得到应用。

国外学者通过将含骨形成蛋白基因和甲状旁腺素基因的真核表达质粒与胶原海绵结合，制备出用于骨修复的基因活化基质(gene activated matrix)材料,他们将这些材料植入鼠和狗的骨缺损处,发现与对照相比,骨修复效果很明显[10-11]。这给我们提供了一种新的直接利用 BMP 基因表达载体治疗骨缺损等骨科疾病的方法。

在本研究中我们将 BMP2–pcDNA3.1 质粒与壳聚糖–胶原海绵支架材料复合,制备出一种基因活化基质材料,将成骨细胞–支架材料复合物进行体外培养,培养 10 天后检测了这些复合物中的碱性磷酸酶活性和钙含量，发现与对照组相比，实验组成骨细胞–支架材料复合物中的碱性磷酸酶活性提高了 60%,钙含量增加了 1.40 倍。另外将成纤维细胞–支架材料复合物进行体外培养,培养 10 天后发现与对照组相比,实验组成纤维细胞–支架材料复合物中的碱性磷酸酶活性提高了 83%，钙含量增加了 54%。另外将该支架材料植入小鼠皮下,10 天后发现与对照组相比，皮下植入物的碱性磷酸酶活性提高了 61.5%,钙含量增加了 16.2%。这个结果表明我们制备的添加了 BMP2–pcDNA3.1 质粒的壳聚糖–胶原海绵支架材料具有一定的成骨诱导活性，接种在该材料中的成骨细胞可保持更好的成骨分化状态,接种在该材料中的成纤维细胞可能被诱导向成骨细胞转变。成纤维细胞虽然是一种分化成熟的结缔组织细胞,但它在细胞外基质的某些信号的刺激下,还能再分化[12],在本实验中,成纤维细胞就很可能向成骨细胞分化了。

胶原海绵是一种优良的生物支架材料，能促使很多细胞的生长,可用于骨和软骨组织工程;而壳聚糖由甲壳素脱已酰化而制备，也已经在骨和软骨组织工程研究方面得到应用[13]。已有研究者以大鼠骨髓基质细胞为种子细胞,以胶原–壳聚糖复合物为支架材料，通过骨组织工程的原理和方法修复牙槽骨缺损。我们将两者混合,制备出壳聚糖–胶原海绵,并将 BMP2–pcDNA3.1 添加在这种混合海绵材料中,实验表明添加在支架材料上的 BMP2 基因发挥了成骨诱导作用。我们制备出的这种材料可不经过基因转染来诱导接种在材料中的细胞成骨分化，这就解决了基因转染效率低而病毒转染可能带来危险的问题。这种材料也可不经过细胞接种的步骤而直接用于骨修复，将可能为骨组织工程中的成骨诱导提供一种新的方法，也可能为骨和软骨缺损的修复和康复治疗提供一种更安全有效的技术。

参考文献

[1] Wozeney JM,Rosen V,Celeste AJ,et al. Novel regulators of bone formation:molecular clone and activites [J]. Science,1988,242: 1528—1534.

[2] Riley EH, Lane JM, Urist MRR,et al. Bone morphogenetic proteins–2:Biology and application [J]. Clin Orthop, 1996,324:39—46.

[3] Noshi T, Yoshikawa T, Dohi Y,et al. Recombinant human bone morphogenetic protein–2 potentates the in vivo osteogenic ability of marrow/hydroxyapatite composites [J].Artif Organs,2001,25 (3):201—2088.

[4] Hotz G,Herr G. Bone substitute with osteoinductive biomaterials current and future clinical application [J]. Int J Oral Maxillofac Surg,1994,23:413—421.

[5] Lieberman JR,Le LQ,Wu L,et al. Regional gene therapy with a BMP–2 producing murine stromal cell line induces heterotopic and orthotopic bone formation in rodents [J].J Orthop Res, 1998,16: 330—339.

[6] Cheng SL, Lou J, Wright NM,et al. In vitro and in vivo induction of bone formation using a recombinant adenoviral vector carrying the human BMP–2 gene [J]. Calcif Tissue Int, 2001, 68(2):87—94.

[7] 尚咏,卢世璧,王继芳,等. BMP–2 基因转染兔骨骼肌干细胞修复骨缺损实验研究[J].中国康复理论与实践,2005,11(4):241—244.

[8] 卜丽莎,李建军,韩东,等. 重组 PcDNA3.1–hBMP–2 转染骨髓基质干细胞及复合异种骨支架体外构建组织工程骨[J]. 中国骨伤, 2004 ,17 (8): 449—451.

[9] 曾凡杰,华子春,胡勤刚,等.重组人骨形成蛋白 2 基因在大肠杆菌中的克隆[J]. 东南大学学报(医学版),2001,20(3):158—160.

[10] Fang J, Zhu YY, Semiley E.et al.Stimulation of new bone formation by direct transfer of osteogenic plasmid genes[J].Proc NatlAcad Sci USA,1996,93:5753—5758.

[11] Bonadio J,Smiley E,Patil P,et al. Localized,direct plasmid–gene delivery in vivo: prolonged therapy results in reproducible tissue regener– ation[J]. Nat Med, 1999,5:753—759.

[12] Bernhard Φ.Palsson,Sangeeta N.Bhatia. Tissue Engineering[M]. 1 ed. New York; Pearson Prentice Hall,2004. 74—81.

[13] 王日雄. 骨与软骨组织工程支架材料特征与研究进展[J]. 中国康复医学杂志,2005,20(3):218—220.